

548



⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑬ DE 197 12 332 A 1

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 Q 1/68  
// G01N 33/574

⑭ Aktenzeichen: 197 12 332.5  
⑮ Anmeldetag: 25. 3. 97  
⑯ Offenlegungstag: 1. 10. 98

⑰ Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim,  
DE

⑱ Erfinder:  
Dietmaier, Wolfgang, Dr., 93049 Regensburg, DE;  
Rüschoff, Josef, Prof., 93077 Bad Abbach, DE;  
Fisher, Richard, Prof., Penn Valley, Pa., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑲ Verfahren zum Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität zur Tumordiagnostik

⑳ Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung genomischer Instabilität an 5 ausgewählten Mikrosatelliten Loci. Die Analyse dieser ausgewählten Loci ist geeignet zur Erstellung von prognostischen Tumordiagnosen, zur Analyse von erblicher Tumorprädisposition sowie zur Tumorfürherkennung. Besondere Bedeutung hat diese Methode bei der Diagnose von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, beispielsweise Colorektaltumoren.

DE 197 12 332 A 1

DE 197 12 332 A 1

# DE 197 12 332 A 1

## Beschreibung

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Kit zur prognostischen Diagnostik, Prädispositionsdagnostik bzw. Früherkennung von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, vorzugsweise Colorectal-tumoren. Grundlage dafür bildet der Nachweis genomischer Instabilität von sogenannten Mikrosatelliten mit Hilfe von PCR.
- Mikrosatelliten (MS) sind kurze Tandem Repeats, die über das gesamte menschliche Genom verteilt vorkommen. Statistisch treten Mikrosatelliten etwa einmal in 100 000 Basenpaaren auf. Bisher sind 5 Klassen von MS beschrieben, die sich nach der Länge ihrer kleinsten repetitiven Einheit als Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, oder Pentanukleotid-Repeat voneinander unterscheiden. In der Regel treten diese repetitive Einheiten 10 bis 40 mal in Tandemanordnung wiederholten auf. Mikrosatelliteninstabilität (MIN) in Form kleiner Deletionen oder Insertionen kann bei vielen Tumorpaticen nachgewiesen werden, wenn man DNA aus Tumormaterial mit normaler DNA des gleichen Individuums vergleicht (Thibodeau et al. (1993), Science, 260, 816-819) (WO 94/19492). Dies geschieht durch Amplifikation der DNA mit Hilfe von PCR und anschließender gelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikationsprodukte. Als Ursache für MIN wird ein dauerhafter Replikationsdefekt der Tumorzellen angeschen (Parsons et al., (1993), Cell, 75, 1227-1236; Shibata et al., (1994) Nat. Genet., 6, 273-281). Solche Tumoren werden als "Replikation-Lerror-Positive" (RER+) klassifiziert. Ein RER+ Phänotyp ist charakteristisch für Colorectal-tumoren in Familien mit HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer) (Aaltonen et al. (1993), Science, 260, 812-816).
- Die Analyse von Mikrosatelliten ist eine äußerst attraktive Methode sowohl für diagnostische Anwendungen als auch für die Untersuchung der Tumorgenese von RER+ Tumoren. Aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit ist die Bestimmung der MIN vor der Sequenzierung der Mismatch Repair Gene von HNPCC Familien ein geeignetes Hilfsmittel zur Identifizierung potentieller RER+ Patienten. Überhaupt von großer Bedeutung ist die MIN Analyse als prognostische Diagnose bei sporadischen Colorectal-Karzinom, weil das Auftreten von MIN mit einer besseren Prognose korreliert (Lothe et al. (1993) Cancer Res., 53, 5849-5852; Thibodeau et al. (1993), Science, 260, 816-819; Bubb et al. (1996) Oncogene, 12, 2641-2649).
- MIN kann in mehr als 90% aller HNPCC-Tumoren nachgewiesen werden (Liu et al., (1996) Nature Med., 2, 169-174), wohingegen MIN in sporadischen Colorectal-tumoren nur mit einer Häufigkeit von 10-20% auftritt (Thibodeau et al. (1993) Science, 260, 816-819; Ionov et al. (1993), Nature, 363, 558-561; Aaltonen et al. (1993) Science, 260, 812-816; Lothe et al. (1993) Cancer Res., 53, 5849-5852). MIN ist jedoch nicht auf Colorectal-tumoren beschränkt, sondern wurde auch in anderen Tumoren nachgewiesen. Dazu zählen unter anderem Pankreas-Karzinome (Han et al. (1993) Cancer Res., 53, 5087-5089), gastrische Karzinome (Han et al. (1993) Cancer Res., 53, 5087-5089; Peltomaki et al. (1993) Cancer Res., 53, 5853-5855; Mironov et al. (1994) Cancer Res., 54, 41-44; Rhyu et al. (1994) Oncogene, 9, 29-32; Chong et al. (1994) Cancer Res., 54, 4595-4597). Prostata-Karzinome (Gao et al. (1994) Oncogene, 9, 2999-3003), Karzinome des Endometriums (Risinger et al. (1993) Cancer Res., 53, 5100-5103; Peltomaki et al. (1993) Cancer Res., 53, 5853-5855) und Mammarkarzinome (Patel et al. (1994) Oncogene, 9, 3695-3700).
- Der Mechanismus der Tumorgenese von RER+ Tumoren ist nicht im Detail bekannt. Bisher wurden fünf Gene identifiziert, deren Defekt zu einem Auftreten des RER+ Phänotyps führen kann. Da in HNPCC Familien sowohl für hMLH1 (Broder et al. (1994) Nature, 368, 258-261) als auch für hMSH2 (Fishel et al. (1993) Cell, 75, 1027-1038; Leach et al. (1993) Cell, 75, 1215-1225) genetische Variabilitäten mit einer Häufigkeit von über 30% nachgewiesen wurden, spielen diese beiden Gene offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von MIN. 2 andere Mismatch Repair Gene, hPMS1 und hPMS2 sind in weniger als 5% aller HNPCC Patienten mutiert, so daß diese Gene wohl eine eher untergeordnete Rolle in RER+Tumoren spielen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß noch weitere, bisher unbekannte Gene an einem effektiven Mismatch Repair beteiligt sind.
- Als bester Grund zu der Annahme, daß MIN eine direkte Rolle bei der Tumorgenese dadurch spielt, daß aufgrund von Defekten im Mismatch Repair System Mikrosatelliten im kodierenden Bereich von Genen mutiert werden, die für die Regulation der Zellproliferation von Bedeutung sind. Beispielsweise wurde ein Repeat von 10 Deoxyadenosinen im kodierenden Bereich des TGF- $\beta$ -Rezeptor C-Gens als MIN-Target identifiziert (Markowitz et al. (1995) Science, 268, 1336-1338). Ein weiteres MIN-Target, das TGF- $\beta$ R-C-Gen, ist in gastrointestinalen Tumoren innerhalb seiner kodierenden Region an einem (G)<sub>n</sub> Repeat mutiert (Souza et al. (1996) Nat. Genet., 14, 255-257). Interessanterweise waren nur 10% aller untersuchten Tumoren mit MIN in beiden Genen mutiert. In anderer (G)<sub>n</sub> MS innerhalb eines Histone-Gens war in keinem der untersuchten Tumoren mutiert (Souza et al. (1996) Nat. Genet., 14, 255-257). Darüber hinaus konnte MIN bisher nur an einem Teil der untersuchten Loci nachgewiesen werden. Ob und inwieweit sich Mikrosatelliten, an denen Instabilität bereits nachgewiesen wurde, hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von MIN unterscheiden, war zum Zeitpunkt der Erfindung nicht bekannt.
- Vielmehr existieren für die Wahl von geeigneten Loci zur Analyse von MIN derzeit keine weiteren Anhaltspunkte. Es ist somit nicht bekannt, ob und wenn ja, welche Loci sich am besten zur eindeutigen Bestimmung von RER+ Phänotypen eignen. Stand der Technik hingegen ist die Analyse von 4 bis 7 zufällig ausgewählten Loci zur Klassifikation des MIN Status beispielsweise in Colorectal-Karzinomen (z. B. Aaltonen et al. (1993) Science, 260, 812-816; Thibodeau et al. (1993) Science 260, 816-819; Lothe et al. (1993) Cancer Res., 53, 5849-5852; Kim et al. (1994) Am. J. Path., 145, 148-156; Bubb et al. (1996) Oncogene, 12, 2641-2649; Plummer and Casley, (1996) Nat. Med., 2, 156-158).
- Am häufigsten wurden dabei Mono- und Dinukleotid-Loci analysiert. Dinukleotid-Repeat Loci lassen sich in diesem Zusammenhang in 2 verschiedene Klassen einteilen:
- Nicht-komplexe Loci, welche innerhalb der zu amplifizierenden Region außer dem Dinukleotid Repeat keine weiteren repetitive Elemente aufweisen (Klasse 2a). Zu diesen Loci gehören APC, D13S175; D3S1283, Mfd26, Mfd28 und Mfd41.
- Komplexe Loci, bei denen neben dem Dinukleotid-Repeat noch weitere repetitive Sequenzen auftreten (Klasse 2b). Zu diesen Loci gehören Mfd15, D10S197, D11S1318, D11S904, D18S69, D2S123, D9S171 sowie TPS3PCR.

# DE 197 12 332 A 1

Darüber hinaus wurden auch Mononukleotid-Repeat Loci aufgrund ihrer guten Amplifizierbarkeit sowie ihrer eindeutigen gelektrophoretischen Signale mehrfach untersucht (Liu et al. (1996) *Nature Med.*, 2, 169-174; Augenlicht et al. (1996) *Oncogene*, 12, 1767-1772; Plummer and Casey, (1996) *Nat. Med.*, 2, 156-158).

Grundlage der Erfindung war somit die Suche nach polymorphen Loci, deren Analyse eine zuverlässige Aussage über die allgemeine Tendenz zur genetischen Instabilität zuläßt. Dabei konnten an unterschiedlichen Mikrosatelliten, an denen bereits nach dem Stand der Technik MTN gefunden wurde, unterschiedliche Häufigkeiten polymorpher Veränderungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß in unterschiedlichen Patienten verschiedene Klassen von Mikrosatelliten mit unterschiedlicher Häufigkeit von genetischer Instabilität betroffen sind. Daraus folgt, daß für eine zuverlässige Bestimmung des RER Phänotyps mit einer begrenzten Anzahl an PCR-Reaktionen eine Analyse verschiedener Klassen von MIS unabdingbar ist.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein tumordiagnostisches Verfahren zur Analyse von Mikrosatelliten-Loci, bestehend aus folgenden Schritten:

- a) Isolierung von genetischer DNA aus humanem biologischem Material
- b) DNA-Amplifikation von 5 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci mit Hilfe von jeweils fünf verschiedenen Primerpaaren, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu amplifizierenden Loci um zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und 0 bis 1 Penta-nukleotid-Repeat Locus handelt.
- c) Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte

Als vorteilhaft hat sich dabei insbesondere eine Ausführungsform erwiesen, bei der die 5 zu analysierenden Mikrosatelliten-Loci ausgewählt werden aus einer Gruppe von Loci bestehend aus: BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69, und TPS3Alu. Als besondere Vorteilhaft hat sich eine spezielle Ausführungsform erwiesen, bei denen zur Analyse von 5 dieser Loci 5 Primerpaare aus einer Gruppe von Primern, repräsentiert durch SEQ ID NOS. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46, ausgewählt werden.

In einer speziellen Ausführungsform werden die 5 Loci BAT26, BAT40, APC, Mfd15 und D2S123 analysiert. Dabei können 1 oder mehrere Primerpaare entsprechend den SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, 36 verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Anwendung dieses Verfahrens zur Bestimmung des RER Phänotyps, dadurch gekennzeichnet, daß bei fehlendem Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei allen 5 untersuchten Loci von einem RER- Phänotyp und bei Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei mehr als einem Locus von einem RER+ Phänotyp ausgegangen wird.

Eine besondere Ausführungsform besteht in der Anwendung des Verfahrens zur prognostischen Diagnose von Tumoren, vorzugsweise bei Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes und insbesondere bei Colorektaltumoren.

Eine andere besondere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens zur Diagnose einer familiären Tumor-Prädisposition, vorzugsweise für Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes und insbesondere für Colorektaltumoren.

Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität in disseminierten Tumorzellen.

Eine zusätzliche Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens vor einer Entscheidung, welche Art von Chemotherapie für einen Patienten eingesetzt werden soll. Dies ist von Bedeutung, da die Durchführung von Chemotherapien häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist, so daß ein für bestimmte Arten von Tumoren unwirksamer Einsatz eines solchen Therapeutikums nach Möglichkeit zu vermeiden ist.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, mindestens bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und 0 bis 1 Penta-nukleotid-Repeat Locus geeignet sind.

Eine besondere Ausführungsform des Kits beinhaltet mindestens 5 Primerpaare, die zur Amplifikation von 5 Loci, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69 und TPS3Alu., geeignet sind. Vorzugsweise besitzen diese Primer Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.

Eine spezielle Ausführungsform des Kits beinhaltet mindestens 5 Primerpaare zur Analyse von BAT26, BAT40, APC, Mfd15, und D2S123 nachgewiesen. Dabei können 1 oder mehrere Primerpaare Sequenzen entsprechend den SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, 36, ... aufweisen.

Zusätzlich zu den 5 Primerpaaren können diese Kits weitere Primerpaare sowie molekularbiologische Reagenzien und Material enthalten, die der erfahrungsgemäßen Durchführung von MTN Analysen dienen.

Als Quelle zur Gewinnung von genetischer DNA kann je nach Aufgabenstellung unterschiedliches biologisches Material analysiert werden. Für die prognostische Diagnostik sowie für die Diagnostik einer familiären Prädisposition wird dem Patienten entnommene Tumorgewebe verwendet. Bei der Anwendung des erfahrungsgemäßen Verfahrens zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von MTN in disseminierten Tumorzellen wird die DNA aus zellulären Bestandteilen enthaltenden Körperflüssigkeiten oder Körperausscheidungen wie zum Beispiel Blut, Serum Plasma, Urin oder Stuhl isoliert.

In der Regel wird eine Kontrollreaktion mit einer DNA durchgeführt, deren Sequenz dem "gesunden" Wild-Typ des zu analysierenden Mikrosatelliten-Locus entspricht. Besonders geeignet ist genetische DNA die aus gesundem, nicht tumorigenem Gewebe desselben Individuums isoliert wurde.

Die Isolierung genetischer DNA aus Formalin-festigtem und in Paraffin eingebettetem Gewebe erfolgt folgendermaßen:

Aufzertigung von 5 µm-Schnitten mit Mikrotom, Aufziehen auf einen Objekträger

# DE 197 12 332 A 1

- Deparaffinierung:  
Inkubation der Objekträger bei 65°C, 1 Stunde  
"Durchziehen" durch Alkoholreihe: 2x15 min in Xylol  
2x15 min in EtOH(abs.)  
2x15 min in EtOII(96%)  
2x15 min in EtOII (70%) (mehrere Wochen in 70% EtOII haltbar)  
Übersetzen der Objekträger in Wasser  
Abkratzen des Gewebes im feuchten Zustand mit Skalpell, Glaskapillare, u. ä. (Mikrodisektion), überführen in 0,5 ml Reaktionsgefäß
- 10 - Zugabe von 20–50 µl Digestion-Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5  
5% Tween 20  
1 mM EDTA  
Zugabe von 7–15 µl Proteinase K (20 mg/ml) (entspricht 30–50% des vorgegebenen Volumens)
- 15 - Inkubation bei 50°C im Thermoblock mit Heizdeckel bis Lösung klar ist (über Nacht)  
- Inaktivierung der Proteinase K: 15 min 94°C.

Fakultativ kann eine weitere Aufräumung der DNA mit dem Quiagen tissue DNA Kit der Firma Quiagen erfolgen.  
Zur Analyse des biologischen Materials wurden die PCR Ansätze nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	Master Mix für 1 Reaktion		
	µl	End konz.	Stammlösung
H2O	37,25		
DMSO	2,5	5%	100%
10 x Expand-HiFi-Buffer (BM)	5	1 x	10 x
dNTPs	1,0	0,2 mM	10 mM
Primer 1:	1,0	0,3 µM	15 µM
Primer 2:	1,0	0,3 µM	15 µM
Taq-Pol. Expand HiFi-Pol (BM)	0,25	1,25 U	5 U
total	48		
hinzufügen:		48 µl Rk.-Mix zu	2 µl template DNA

Alternativ wurden in einer Duplex- bzw. Multiplexanalyse auch 2 oder mehrere Loci in einem Reaktionsansatz zusammen analysiert, sofern deutlich voneinander unterscheidbare Fragmentengrößen zu erwarten waren. Dazu wurde 2 oder mehrere Primerpaare mit einer gleichen Endkonzentration von 0,3 µM je Primer eingesetzt.

Die PCR-Amplifikationen wurden unter Standardbedingungen mit 100 ng gereinigter genomischer DNA in einem MJ Research Thermocycler (PTC100, MJ Research, Watertown, MA) mit folgenden Zyklen durchgeführt:

- 45 94°C 3 min (einmalige Denaturierung)
- 35 Zyklen:  
94°C 1 min  
Annealingstemperatur 50–68°C, 1 min  
entsprechend Abb. 1
- 50 72°C 1 min  
72°C 8 min.

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem denaturierenden, 6,7%igen Polyacrylamidgel mit 50% Harnstoff für etwa eine Stunde bei 1800 Volt und 55°C in einer SequiGen Sequenzgelkammer (BioRad, Hercules, CA) aufgetrennt und mit Silbernitrat (Budowle et al., (1991) Am. J. Hum. Genet., 48, 137–144) in einem modifizierten Färbebad (Bender et al., (1994) Biotechniques, 16, 204–206) angefärbt (Schlegl et al., (1995) Virchows Archiv, 426: 223–227).

## Polyacrylamidgelectrophorese zur Auftrennung der PCR Banden

- 60 (6,7%iges PA-6M Harnstoffgel, Vertikalapparatur sequi-GenGT, BioRad)

- 3 µl PCR-Produkt
- 3 µl Loading buffer (10 ml Formamid
- 10 mg Xylenc Cyanol
- 10 mg Bromophenolblau
- 200 µl EDTA, 0,5M
- Denaturierung, 94°C, 5 min.
- 15 min PA-Gelvorauf bei 2300 V (bis 55°C erreicht ist)

# DE 197 12 332 A 1

- Beladen des PA-Gels
- 45-75 min Laufzeit bei 180°C

## Detection der aufgetrennten PCR-Produkte durch Silberfärbung

5

Wärmeaustauschplatte vom PA-Gel (zwischen Wärmeaustauschplatte und Glasplatte) abnehmen und Plexiglas für verhüten auf das PA-Gel (an Glasplatte haftend) legen und mit Klammern fixieren.

- Zugabe von folgenden Lösungen:

H<sub>2</sub>O: kurz spülen  
10% Ethanol: 10 min  
1% Salpetersäure: 3 min  
H<sub>2</sub>O: spülen  
0,012 M Silbernitrat: 20 min

10

H<sub>2</sub>O: spülen  
0,28 M NaCO<sub>3</sub>/0,019% Formalin: spülen  
0,28 M NaCO<sub>3</sub>/0,019% Formalin: 3-6 min (bis Bänder sichtbar)  
10% Essigsäure: 3 min

15

H<sub>2</sub>O: 3 min  
- Pärberahmen entfernen

20

- Whatmann 3MM Papier auf PA-Gel legen und damit PA-Gel von Glasplatte abziehen
- PA-Gel mit Frischhaltesolie bedecken und 1 h im GelDryingSystem (iodal) trocknen (so behandelte Gels sind praktisch unbegrenzt haltbar).

25

DNA aus 27 Patienten mit Colorectalkarzinom wurde an 25 verschiedenen MIS-Loci auf MIN untersucht. Das ausgewählte Patientenkollektiv wurde aus einer Gruppe von 200 Patienten vorselektiert, bei denen in einer früheren prospektiven Studie 5 MIS Loci analysiert worden waren (APC, D9S 171, TP 53, D13S175, D11S904). Bei diesen 27 Patienten war in 5 Fällen MIN an mindestens 2 Loci nachgewiesen worden, 5 weitere Fälle zeigten Instabilität an einem Locus und mussten daher als "lowMIN+" klassifiziert werden.

30

In 17 Fällen konnte keine Instabilität nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden eine MIS-stabile Zelllinie (SW480) und eine Zelllinie mit RER+Phänotyp (HCT116), welche einen Defekt im hMSH2 Mismatch Repair Gen aufweist, mit dem Tumormaterial verglichen.

35

Für eine detaillierte Analyse des MIN-Status dieser Tumoren wurde die MIS-Analyse auf insgesamt 25 MIS Loci ausgedehnt. Vertreter aller sechs unterschiedlichen Repeat-Typen wurden analysiert: 3 Mononukleotid-Repeat Loci (BAT 25, BAT 26, BAT 40), 6 CA-Dinukleotid-Repeats der Klasse 2a (APC, D13S175, D3S1283, Mfd26, Mfd28 und Mfd41), 8 Diakukleotid-Repeats der Klasse 2b (Mfd15, D10S197, D11S1318, D11S904, D18S69, D2S123, D9S171, TPS3PCR), zwei Loci mit Trinukleotid-Repeats (AR, TBP), drei Loci mit Tetranukleotid-Repeats (IPRK1, MYCL 1, RB), und zwei Loci mit Pentanukleotid-Repeats (FMR2, TP53aln). Die genauen Sequenzen dieser Repeats wurden entweder der GenBank Datenbank entnommen oder durch Direktesequenzierung von PCR-Präprodukten überprüft. Abb. 1 gibt einen Überblick über die analysierten Loci sowie die jeweils zur Amplifikation verwendeten Primer, deren Sequenzen in SEQ ID NOs. 1-50 wiedergegeben sind. Abb. 2a zeigt exemplarisch Amplifikationen unterschiedlicher Allele aller 25 untersuchten Genloci. Abb. 2b zeigt exemplarisch eine Duplexanalyse der Loci BAT40 und D3S1283. Bei Auftritt eines Verlustes von Allelen durch tumorbedingten Heterozygotitäts-Verlust (loss of heterozygosity, LOH) (LiMao et al., (1996), Science, 271, 659-662) wurde das Ergebnis der jeweiligen PCR in dieser Studie nicht mitberücksichtigt.

40

45

## Identifikation von RER+ Tumoren

50

Um abzuklären, welche Tumoren mit Sicherheit als RER+ klassifiziert werden können und um zu untersuchen, ob einige Tumoren als "schwach RER+" eingestuft werden müssen, wurden die verschiedenen Tumoren untereinander verglichen. Nach dem Stand der Technik existiert derzeit keine einfache Methode nach dem "entweder oder" Prinzip zur eindeutigen Klassifizierung eines Tumors als RER+ oder RER-. Das vorselektierte Kollektiv von 27 Colorectatumorpatienten, von denen ursprünglich 17 als RER-, 5 als RER+ und 5 als "lowMIN+" diagnostiziert wurden, ergab nach Analyse weiterer Loci ein wesentlich differenzierteres Bild bezüglich der Verteilung von MIN.

55

Wie in den Abb. 3 und 4a dargestellt, konnten 3 Tumoren mit einer MIN-Rate von mehr als 50% (14MIN/24 Loci, Nr. 1, 8 und 16), ein Tumor mit 42% (10MIN/24Loci, Nr. 5), ein Tumor mit 38% (9MIN/24Loci, Nr. 2) und ein Tumor mit 29% (7MIN/24Loci, Nr. 13) nachgewiesen werden. Damit besitzen all diese Tumoren als gemeinsames Kriterium eine Instabilitätsfrequenz von über 25% der analysierten Loci. Deshalb wurden diese insgesamt 6/27 Tumoren als eindeutig RER+ klassifiziert.

60

Darüber hinaus wurden 8 zusätzliche Tumoren identifiziert, die 1 bis 2 MIN-Ergebnisse aufwiesen ( $\alpha=8$ , MIN-Prozent:  $\leq 8\%$ ) und daher als "lowMIN+" klassifiziert wurden. Im Vergleich zu der früheren Studie, bei der nur 5 anstatt 25 MIS Loci analysiert wurden, konnten durch die neue Studie nur 13 anstatt vorher 17 Fälle als RER- klassifiziert werden. Dieses Ergebnis, erzielt durch eine Ausweitung der Analyse auf 25 MIS-Loci, unterscheidet sich damit grundsätzlich von früheren Studien nach dem Stand der Technik und verdeutlicht das Problem einer unzuverlässigen RER-Klassifikation, wenn für eine solche Klassifikation eine kleine Anzahl an MIS Loci zufällig ausgewählt wird. In diesem Zusammenhang ist allerdings von besonderer Bedeutung, daß kein Tumor mit einer mittleren Instabilität an 3 bis 6 Loci entsprechend einem Prozentsatz von 10-25% nachgewiesen werden konnte, so daß bei einer MIN Rate von über 25% eine RER+ Klassifikation eindeutig vorgenommen werden kann.

65

# DE 197 12 332 A 1

## Unterschiedliche MIS Loci zeigen unterschiedliche MTN-Häufigkeiten

Insgesamt waren in 14 der 27 untersuchten Tumoren Mikrosatelliten von Instabilität betroffen. Wie erwartet, trat MTN dabei in einigen Tumoren vermehrt auf; zusätzlich wurden jedoch auch einzelne Ereignisse an MTN in weiteren Tumoren nachgewiesen. Um zu ermitteln, ob MTN-Häufigkeit vom Repeat-Typ abhängt, wurden die MTN-Frequenzen für jeden Repeat-Typ separat ermittelt und mit der durchschnittlichen MTN-Frequenz der Gesamtheit der getesteten Mikrosatelliten verglichen: Die durchschnittliche MTN-Rate bezogen auf alle pro Patient untersuchten Loci betrug 11,4% (78 MTNs/25 Loci = 3,1 MTN/Locus; durchschnittliche MTN Rate = 3,1/27 Patienten 11,4%). Die durchschnittlichen Frequenzen innerhalb der einzelnen Repeat-Typen waren dagegen unterschiedlich: sämtliche Mononukleotid-Repeats waren überdurchschnittlich oft verändert (5,0 MTNs/27 Patienten = 18,5% = + 7,1%); alle anderen Repeat-Typen waren seltener als die Mononukleotid Repeats betroffen. Sowohl die MTN Raten von komplexen Dinukleotid-Loci als auch von nicht komplexen Dinukleotid Loci unterschieden sich nicht signifikant von dem für die Gesamtheit aller Loci bestimmten Mittelwert (0,3 bzw. 0,9%). Ähnliches gilt für die Tetranukleotid-Repeats (+1,4%), die allerdings bezogen auf den jeweils einzelnen Locus eine starke Heterogenität aufweisen (-11,4% bis + 14,5%). Erhöhte MTN-Frequenz wurde für beide Tri-nukleotid Repeats ermittelt (+3,4%). Pentanukleotid Repeats zeigten dagegen unterdurchschnittliche MTN-Frequenzen (-4,0%). An einem Locus dieses Typs (FMR2) wurde überhaupt keine MTN nachgewiesen. Daraus folgt, daß die Bestimmung der Frequenz von MTN-Ereignissen dramatisch von der Auswahl der analysierten Loci abhängig ist.

Bestimmte MIS Loci sind häufiger spezifisch in RER+ Tumoren verändert

Deshalb ist für die Analyse des MTN Status von Bedeutung, ob es bestimmte Loci gibt, die spezifisch und regelmäßig in RER+ Tumoren von MTN betroffen sind. Ein einheitliches Ergebnis wurde diesbezüglich nur bei MIS mit Mononukleotid Repeats erzielt (BAT 25, BAT 26, BAT 40). Jeder dieser Loci war in den gleichen 5 RER+ Tumoren verändert (Nrs. 1, 2, 8, 13, 16), aber keiner wies MTN in RER- Tumoren oder "lowMTN" Tumoren auf. Im Gegensatz dazu waren bis auf Mfd15 alle anderen getesteten Loci entweder weniger oft in den RER+ Tumoren mutiert oder zusätzlich in "lowMTN" Tumoren verändert. Beispielsweise konnte für den APC Locus nicht nur in allen RER+ Tumoren, sondern auch in Tumor Nr. 20 MIS nachgewiesen werden. Fünf Loci zeigten MTNs in 4/6 RER+ Tumoren, aber nur D2S123 war in Nicht-RER+ Tumoren unverändert. Im Gegensatz dazu zeigte Locus MYCL1, der ebenfalls in 4/6 RER+ Tumoren verändert war, zusätzlich Instabilitäten in 3 "lowMTN" Tumoren, so daß beispielsweise dieser Locus als Marker ungeeignet ist.

Daher erfordert eine Beschränkung auf 5 Marker zur Analyse von Mikrosatelliteninstabilität eine gezielte Auswahl der Loci so daß dennoch gewährleistet ist, daß die Zahl der nicht eindeutig zu klassifizierenden lowMTN+ Fälle minimiert wird und alle RER+ Träger mit einem höchsten Maß an Wahrscheinlichkeit identifiziert werden können.

## 35 Kurze Beschreibung der Abbildungen

**Abb. 1** zeigt eine Tabelle mit den wichtigsten Kennzeichen der analysierten MIS Loci (Locussymbol, Markermarke, chromosomale Lokalisation, Repeat-Typ) sowie den Parametern für die jeweilige PCR-Amplifikation (PCR-Tm; Hybriddisierungstemperatur).

**Abb. 2a** zeigt die gelektrophoretische Analyse von 25 untersuchten Mikrosatelliten Loci. Die verschiedenen Allele der erfundungsgemäß zu analysierenden Loci BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123 und TP53Alu lassen sich deutlich voneinander unterscheiden. **Abb. 2b** zeigt exemplarisch eine Duplexanalyse der Loci BAT40 und D3S1283 in einem Reaktionsansatz.

**Abb. 3** stellt das Ergebnis der durchgeföhrten Studie in einer Übersicht dar. 27 Patienten mit Colorectal-Tumoren wurden auf MTN an 25 verschiedenen Allelen untersucht. Das Ergebnis zeigt, daß (i) unterschiedliche MIS in unterschiedlicher Häufigkeit von polymorphen Veränderungen betroffen sind und (ii) in unterschiedlichen Patienten verschiedene Klassen von Mikrosatelliten mit unterschiedlicher Häufigkeit von genomsicher Instabilität betroffen sind.

**Abb. 4** klassifiziert die Tumoren aus dem untersuchten Patientenkollektiv von 27 Personen nach der Anzahl der ermittelten MTN-Ereignisse.

**Abb. 4a** repräsentiert die Auswertung aller 25 MIS. Die Verteilung zeigt, daß eine Gruppe von 6 Patienten existiert, bei denen MTN häufiger als 7 mal eustellt, so daß dieser Klasse eindeutig der Phänotyp RER+ zugeordnet werden kann. Darüber hinaus existiert eine Gruppe von 8 Patienten, bei denen 1 oder 2 MTN nachgewiesen wurden und die damit als "lowMTN+" klassifiziert sind.

**Abb. 4b** repräsentiert die erfundungsgemäße Analyse von 5 ausgewählten MIS wie in Beispiel 1 beschrieben. Diese Analyse führt ebenfalls zu einer Verteilung, aufgrund derer eine eindeutige Entscheidung über den RER+ Phänotyps getroffen werden kann. Nur 2 Patienten (Nr. 7. TP53 Alu Locus und Nr. 20, APC Locus) müssen nach diesem Verfahren als lowMTN+ klassifiziert werden.

**Abb. 4c** repräsentiert die Analyse einer anderen erfundungsgemäßen Auswahl von 5 MIS gemäß Beispiel 2, die mit einer Ausnahme (APC, Patient 20) ebenfalls eine eindeutige Klassifikation des RER Phänotyps ermöglicht.

**Abb. 5** zeigt Geburtsdatum Alter und klinische Daten zum untersuchten Patientenkollektiv, Stand August 1994. (T, N, M: Tumorklassifikation, G: Grade, I.OK: Tumorlokalisierung, re: Colon rechts, li: Colon links, R: Rectum). Die folgenden Beispiele erläutern die Erfördung weiter:

Beispiel 1: Auswahl von 2 Mononukleotid-Repeat Loci, 1 Dinukleotid-Repeat-Locus der Klasse 2a, 1 Dinukleotid Locus der Klasse 2b und 1 Pentanukleotid-Repeat Locus

Wie die Studie zeigte, ergaben sich bei der Verwendung von Mononukleotid Repeat Loci zur Bestimmung RER+ Phänotyps keine falsch-positiven Resultate, so daß eine Analyse dieser Loci besonders geeignet erschien. Außerdem

# DE 197 12 332 A 1

konnten nicht alle RER+ Tumoren durch die Analyse von Mononukleotid Repeat Loci nachgewiesen werden. So war beispielsweise Tumor Nr. 5 eindeutig RER+, wies aber keine Instabilität bezüglich der Loci BAT2S, BAT26 und BAT40 auf, obwohl MIN an 9 Loci mit anderen Repeat Typen nachgewiesen werden konnten. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, für eine möglichst exakte Bestimmung des RER Phänotyps bei einer begrenzter Anzahl von 5 analysierten Loci eine Kombination aus verschiedenen Repeat Typen auszuwählen. Dadurch wird gewährleistet, daß trotz der geringen Zahl an analysierten Loci einerseits alle RER+ Träger mit einem höchst möglichen Maß an Wahrscheinlichkeit identifiziert werden können und andererseits die Zahl der nicht eindeutig zu klassifizierenden lowMIN+ Fälle soweit wie möglich minimiert wird.

Aufgrund der durch die Studie mit 27 Tumoren ermittelten Häufigkeiten wurden zur Bestimmung des Phänotyps folgende Kriterien festgelegt: bei mindestens 2 MIS-positiven Loci sollte von einem RER+ Phänotyp ausgegangen werden, bei keinem positiven Nachweis von MIS sollte von einem RER- Phänotyp ausgegangen werden. Der Nachweis von genau einem MIN Ereignis wurde als "low MIN+" definiert. (Letzteres erfordert im Zweifelsfalle die Analyse weiterer MIS Loci.)

Die Auswertung der 27 Tumoren bezüglich der erfundungsgemäß ausgewählten Loci BAT' 26, BAT' 40, APC, Mfd15, TPS3Alu nach diesem Verfahren führte zu dem in Abb. 4b dargestellten Ergebnis. Für alle 6 Tumoren die durch die Analyse von 25 Loci als RER+ klassifiziert worden waren, wurde eine Häufigkeit von mindestens drei MIN Ereignissen bestimmt. Somit wurden diese Tumoren auch durch die Analyse der 5 ausgewählten Loci als RER+ klassifiziert. Nur zwei Tumoren (Nr. 7, Nr. 20) wurden nach diesem Verfahren als "lowMIN+" klassifiziert und sind somit nicht eindeutig zu interpretieren.

Beispiel 2: Auswahl von 2 Mononukleotid-Repeat Loci, 1 Dinukleotid-Repeat-Locus der Klasse 2a und 2 Dinukleotid Loci der Klasse 2b

Die Auswertung der 27 Tumoren erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 1, jedoch mit einer modifizierten, ebenfalls erfundungsgemäßen MIS-Auswahl (BAT26, BAT 40, APC, Mfd15 und D18S69). Das Ergebnis ist in Abb. 4c dargestellt. Sämtliche Tumoren mit RER+ Phänotyp waren in mindestens drei der ausgewählten Loci verändert. Somit konnten auch durch diese Auswahl an Loci alle 6 bekannten RER+ Tumoren eindeutig als RER+ identifiziert werden. Nur ein Tumor wurde in diesem Falle als "lowMIN+" und damit als nicht eindeutig interpretierbar klassifiziert.

Beispiel 3: Bestimmung des RER Phänotyps als prognostischer Indikator

Zum Nachweis der Eignung einer erfundungsgemäßen Auswahl von 5 Loci zur Bestimmung des RER Phänotyps wurden die in Abb. 5 tabellarisch enthaltenen klinischen Daten mit den Ergebnissen der MIN Analyse aus Beispiel 1 verglichen. Wie in diesem Beispiel offenbart, führte die Analyse der getesteten Loci zum Nachweis von RER+ bei 6 von insgesamt 27 untersuchten Tumorpatienten. Nur 2 von 6 (33%) dieser RER+ Patienten waren zum Abschluß der Studie verstorben. Beide waren zu diesem Zeitpunkt über 80 Jahre alt. Im Gegensatz dazu waren bereits 8 von 19 (42%) der in Beispiel 1 als RER- klassifizierten Patienten verstorben. Ihr Altersdurchschnitt hätte zum Zeitpunkt der Studie 64 Jahre betragen. Daraus ist ersichtlich, daß eine erfundungsgemäße Analyse von 5 Mikrosatelliten Loci eine prognostische Aussage über den Verlauf der Tumorerkrankung ermöglicht.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 12 332 A 1

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH  
(B) STRASSE: Sandhoferstr. 116  
(C) ORT: Mannheim  
(D) LAND: DE  
(F) POSTLEITZAHL: 68305  
(G) TELEFON: 06217591456  
(H) TELEFAX: 06217594457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis von  
Mikrosatelliten-Instabilität zur Tumordiagnostik

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 50

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAACAGGATG CCTGCCTTA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGACTTTCCA CCTATGGGAC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGCAGTACCA CCTGTAGAAA TC

22 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

25

GAGTAACAGA GGCATCGTGT ATTC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

30

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ACTCACTCTA GTGATAAAATC G

21

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGCAGATAAG ACAGTATTAC TAGTT

25 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

65

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

10 AGCTAAGTGA ACCTCATCTC TCTCT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- 15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ACCCTAGCAC TGATGGTATA GTCT

24

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AACACTAGTG ACATTATTTT C

21

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

60 AGCTAGGCCT GAAGGGTTCT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- 65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ACCACTGCAC TTCAGGTGAC

20 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

25

GTGATACTGT CCTCAGGTCT CC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

30

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATGACAAGCA ATCCTTGAGC

20

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTGTGTTATA TCCCTAAAGT GGTGA

25 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

65

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 16 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

10 CCCGTATGGC AACAGG

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- 15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TGTGCATGTC ATGAGTG

17

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATTGGATAAC TTGAATCTGC TG

22

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

60 TGCATCACCT CACATAGGTT A

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- 65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGAAGAACATCA AATACACAAT

20 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

25

GCTGGCCATA TATATATTAA AACCC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

CAGGTTCTGT CATAGGACTA

20

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TTCTGGAAAC CTACTCCTGA

20

60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

- (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKULS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

10 CAGAAAATTG TCTCTGGCTA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CTCATGTTCC TGGCAAGAAT

20

(2) ANGAREN BY SEO ID NO: 35

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

  - (A) LANGE: 16 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

### (iii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

GCTCCCCGGCT GGTTTT

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

60 GCAGGAAATC GCAGGAACTT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

- (B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CTCTTTCTCT GACTCTGACC

20

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

15

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GACTTTCTAA GTTCTTGCCA G

21

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

30

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

AGCGCCAGCAC CTCCCCGGCGC CAGTTT

26

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

50

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

GCTGCTGCTG CCTGGGGCTA GTCTCTT

27

60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

65

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

- (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

#### (11) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

10 TCGGCTCCAA GAATGTAAGT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEO ID NO: 32:

TCTGCATTTT AACTATGGCT C

21

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

TGACTACTTT TGACTTCAGC C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

AACCATTCAA CATTTTTAAC CC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

- (B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

ATTAACCTCC TACACCACAA C

5

10

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

15

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

CTACAGCAAC ACCAACCTTC

19

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

30

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

CGGTTATCCC AGTTGGCCT CTCTGGGAT

40

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

50

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

TCCACCTCCC GCTCAGTCAG ACTGCGCT

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

65

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

- (B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

10 CCAGCTATAA TGACTAGAAAT GAAGTCCTAC TG

32

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

- 15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

TTGAATTAAA GACTTGTAA AACACAAAAAT TTAGAC

36

,

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

TGGCGAGACT CCATCAAAG

19

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

CTTTTTAAGC TGCAACAATT TC

22

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

CTCCTCCCTA CTTACTTGT

19

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

AATTAACAAG GTGTGGTGG

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

20 GCACTTCCCT CAACTCTACA

20

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

AACAGCTCCT TTAATGGCAG

20

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

50 AGGGATACTA TTCAGCCCGA GGTG

24

55 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

65 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

ACTGCCACTC CTTGCCCAT TC

22

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

CCCACAGCCT ATTCAAGAACAC C

21

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

GTTGACTGCT GAACGGCTGC

20

40

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Mikrosatelliten-Loci, bestehend aus folgenden Schritten:
  - a) Isolierung von genetischer DNA aus humanem biologischem Material;
  - b) DNA-Amplifikation von 5 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci der DNA mit Hilfe von jeweils fünf verschiedenen Primerpaaren, wobei es sich bei den zu amplifizierenden Loci um zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und gegebenenfalls ein Pentalukleotid-Repeat Locus handelt;
  - c) Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die 5 Mikrosatelliten-Loci ausgewählt werden aus einer Gruppe von Loci bestehend aus: BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69 und TP53Alu.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die 5 Mikrosatelliten-Loci: BAT26, BAT40, APC, Mfd15 und D2S123 analysiert werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, und 36.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5 zur Bestimmung des RER Phänotyps, dadurch gekennzeichnet, daß bei fehlendem Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei allen 5 untersuchten Loci von einem RER Phänotyp und bei Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei mehr als einem Locus von einem RER+ Phänotyp ausgegangen wird.
7. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur prognostischen Tumordiagnose.
8. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Diagnose von familiärer Tumor-Prädisposition.
9. Verwendung gemäß Anspruch 7 oder 8 zur Indikation von Tumoren des Gastrointestinalsystems und des Endometriums.
10. Verwendung gemäß Anspruch 9 zur Indikation von Colorectalkarzinomen.
11. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von Mikrosa-

# DE 197 12 332 A 1

- teliten Instabilität in disseminierten Tumorzellen.
12. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1–6 zur Therapieentscheidung.
13. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, mindestens bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von zwei Mononukleotid-Repeat-Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und gegebenenfalls einem Pentanukleotid-Repeat-Locus geeignet sind.
14. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von 5 Loci, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18569 und TP53A.u, geeignet sind.
15. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, bestehend aus 5 Primer-Paaren, von denen mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOS. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.
16. Kit gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß 5 Primer-Paare enthalten sind, welche zur DNA-Amplifikation von BAT26, BAT40, APC, Mfd15, und D2S123 geeignet sind.
17. Kit gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, mindestens 1 Primerpaar enthalten ist, welches ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOS. 1,2, 5, 6, 19,20, 33, 34, 35, und 36.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**- Leerseite -**

ZEICHNUNGEN SEITE 1

**Nummer:**

Int. Sci.

### **INT. GR. :**

DE 197 12 332 A1

C 120 158

1. Oktober 1998

Reference	Markername	Chrom. loc.	Primersequenz	Motif	Fragmentlänge [bp]	
D8S123 f	AFM0934n3	2p16	AAA CAG GAT GGC TGC CCT TA GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	CA	187-227	
D8S123 f	AFM1183y3	3p24/2p22	GCG ACG ACC AAC CGT ASA AAT G TAA CAG AGC CAT CGT GIA TIC	CA	150-160	
D8S123 f	LNB-CA1	5q21/722	ACT CAC TGT CTG GAT AAA TGC AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T	CA	96-122	
D8S123 f	(APC)	AFM-1860c3a	9p21	AGC TAA GTG AAC CTC ATG ICIGT GTC T	CA	159-177
D8S123 f	AFM1183y3	6q21	AAC CTA GCA CGC ATG GIA TGA TCT	CA	187-227	
D8S123 f	14p12CA	10p12	AAC AGT AGT GAC ATT ATTC AGC TAG GCC TAA AGG CCT CTC	CA	142-156	
D16S500 f	AFM1183y3	10q12	ACC ACT GCA CCT TAC GIG AC	CA	181-173	
D16S500 f	AFM1183y3	12	GTC ATA CTG CGC TCA GGT CTC C	CA	185-201	
D16S500 f	AFM0934n3	5q11	TAC AGA ACC TAT CCT TGA GC	CA	187-227	
D16S500 f	AFM1183y3	14	CTC TGT TAT ATC CCT AAA GIG GTGA	CA	187-227	
D19S101 f	AFM210p13a	11p15.5	CCC GTA TGG CAA CAG G TGT GCA TGT MCA TGA GIG	CA	ca 130	
D19S101 f	AFM210p13a	16	TAT TGG ATA CCT TCA TCT GCG G TCC ATC ACC TCA CAT AGG TTA	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	17	13c11	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	18	17q11.2-17q11.2	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	19	GGG AGA ATG AAA TAG AGA AT GCT GCG CATA TAA TAT TAA AAC	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	20	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	21	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	22	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	23	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	24	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	25	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	26	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	27	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	28	17q12-17q11.1	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	29	Xcan-q13	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	30	AR 7235	CA	131-113	
D19S101 f	AFM210p13a	31	BAT-231	ATG	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	32	BAT-25f	ATG	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	33	BAT-28f	ATG	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	34	BAT-28f	ATG	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	35	BAT-40f	ATG	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	36	BAT-40f	ATG	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	37	FMR2 d	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	38	FMR2 d	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	39	HPR11d	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	40	HPR11d	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	41	MYCL1-D	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	42	MYCL1-D	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	43	RB-J	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	44	RB-D	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	45	1p53Nuf	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	46	1p53Nuf	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	47	TP35-PCR13.1	X	ca 80	
D19S101 f	AFM210p13a	48	TP35-PCR13.1	X	ca 80	
D19S101 f	TPB-4	8q27	X	ca 80		
D19S101 f	TPB-4	50	X	ca 80		
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Sparo, L.					Nature 359:394-395, 1992	
Nucl. Acids Res. 13:48-52, 1985					Nucl. Acids Res. 13:48-52, 1985	
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Glynn, G					Nature Genet. 7:246-248, 1994	
Wiesenthal, J					Nature 359:394-395, 1992	
Weber, J.L. et al.					Nucl. Acids Res. 18:4640-4650, 1990	
Weber, J.L. et al.					Nucl. Acids Res. 18:4640-4650, 1990	
Staub, R.E.					Science 251:1840-1840, 1990	
Genomics 15:485-493					Science 251:1840-1840, 1990	
Or, C Nature 380:152-154, 1986					Science 251:1840-1840, 1990	
Papadopoulou, N. et al.					Nature 359:394-395, 1992	
Science 285:1915-1917					Nature 359:394-395, 1992	
Papadopoulou, N. et al.					Nature 359:394-395, 1992	
Science 261:1915-1917					Nature 359:394-395, 1992	
Parthenica Matikoudi von					Dr. Richard Fietel	
Richard Fietel					Matikoudi, T.P. et al.	
Jones, M.H.					Hum Mol Genet 1:217-222, 1992	
Genes Chromosom Cancer 5:215-223					Hunting. Cancer Res 5:215-223, 1993	
Polymorphisms					Nucl. Acids Res. 19:3207-3217, 1991	
Nucl. Acids Res. 19:3207-3217, 1991					Genes Chromosom Cancer 5:215-223, 1993	

Abb. 1

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:  
Int. Cl. 5:  
Offenlegungstag:

**DE 197 12 332 A1**  
**C 12 Q 1/68**  
1. Oktober 1998

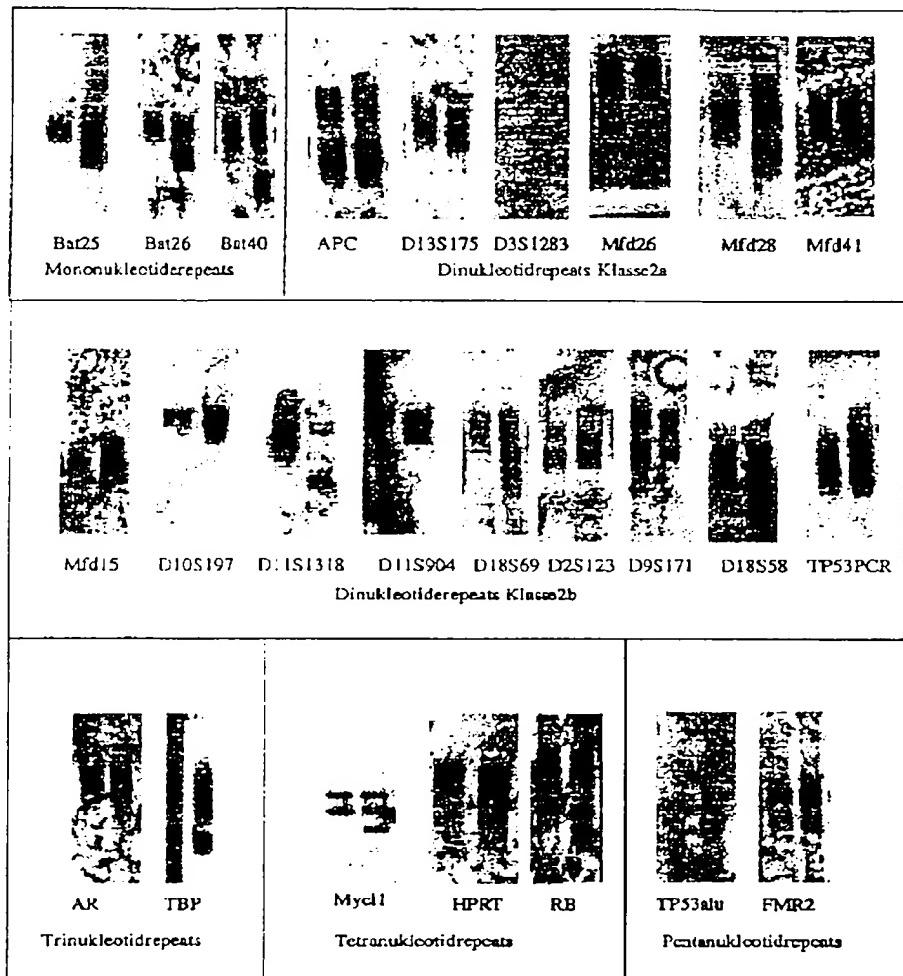


Abb. 2a

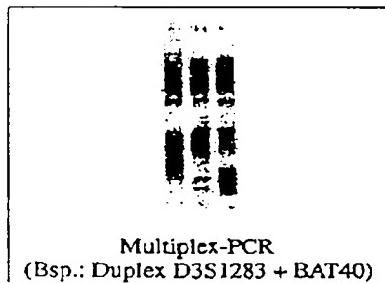


Abb. 2b

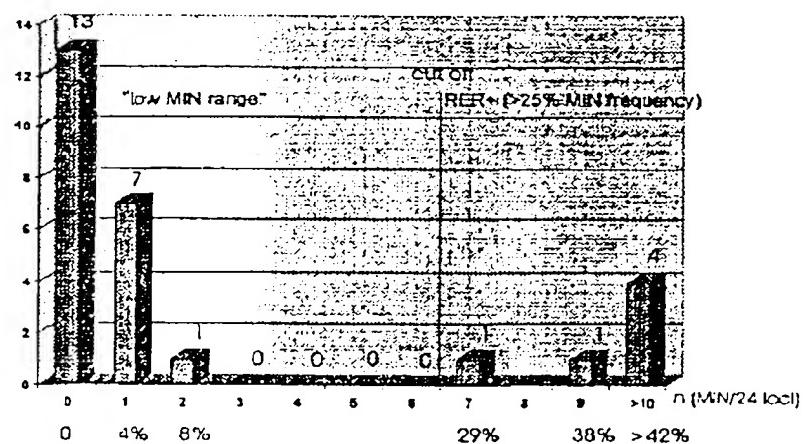
Tumorpatient		MIS locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Repealtyp																													
Mono	BAT25		•																										
	BAT26		•																										
	BAT40		•																										
Di	APC		•																										
Klasse 2a	D13S175																												
	D3S1283																												
	MGF26																												
	MGF28																												
	MGF41																												
Di	MGF15																												
Klasse 2b	D10S197																												
	D11S1318																												
	D11S904																												
	D18S69																												
	D2S123																												
	D9S171																												
	D16S558																												
	TPS3PCR																												
Tri	AR																												
	TBP																												
Tetra	HPRT																												
	MYCL1																												
	RB																												
Penta	FMR2																												
	TP53Alu																												

• : MIN

Abb. 3

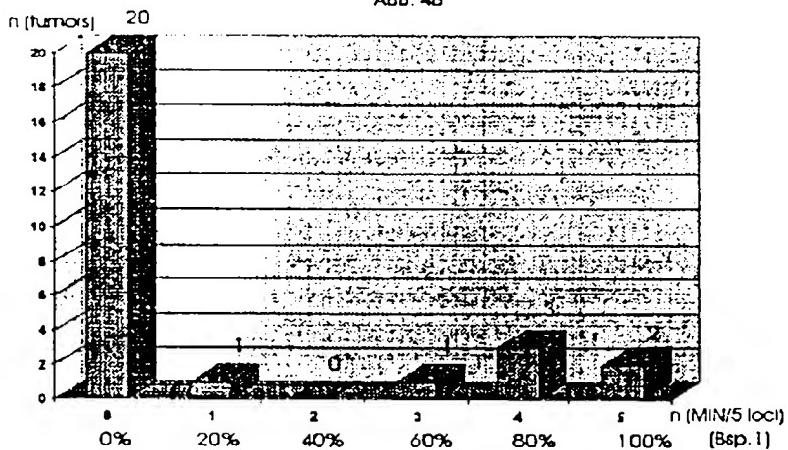
n (tumors)

Abb. 4a



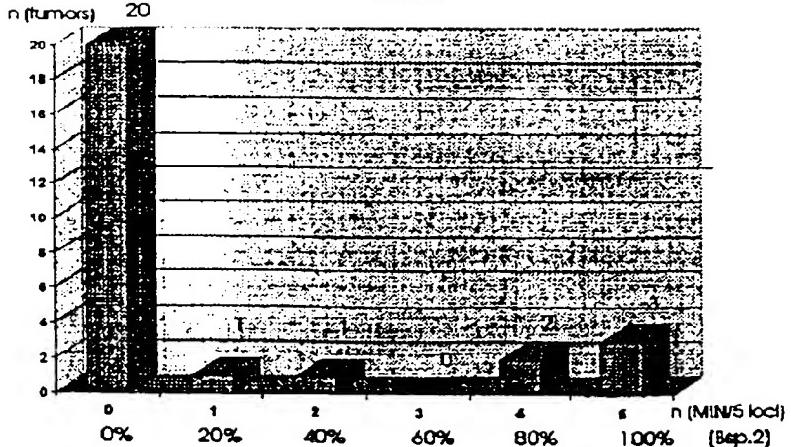
n (tumors)

Abb. 4b



n (tumors)

Abb. 4c



## ZEICHNUNGEN SEITE 5

Nummer:

DE 197 12 332 A1

Int. Cl. 6:

C 12 Q 1/68

Offenlegungstag:

1. Oktober 1998

Patient	GEB	AGE	lebt	T	N	M	G	LOK	Klass. Bsp1
1	22.02.12	80	nein	4	3	X	3	re	RER+
2	23.01.49	44	ja	3	0	0	2	rc	RER+
3	10.09.28	64	ja	2	0	0	2	R	RER-
4	09.02.19	74	ja	2	0	0	2	re	RER-
5	20.08.28	64	ja	3	1	X	3	R	RER+
6	04.06.29	64	nein	4	0	0	3	R	RER-
7	15.06.37	56	ja	3	0	1	2	R	lowMin+
8	25.11.24	70	ja	2	1	0	3	re	RER+
9	31.07.19	74	nein	4	0	0	3	R	RER-
10	22.06.29	64	nein	3	2	0	2	li	RER-
11	31.03.41	52	ja	0	0	0	2	R	RER-
12	30.04.46	47	ja	3	1	0	2	R	RER-
13	13.08.36	57	ja	3	1	0	3	re	RER+
14	03.09.28	65	ja	3	0	0	2	R	RER-
15	14.07.34	59	ja	1	0	0	2	R	RER-
16	22.07.09	84	nein	3	0	0	2	re	RER+
17	19.11.16	78	nein	3	2	X	2	R	RER-
18	13.03.50	44	ja	is	0	0	2	li	RER-
19	08.06.23	70	ja	2	0	0	2	R	RER-
20	01.07.37	57	nein	2	c	X	2	re	lowMin+
21	01.07.37	57	nein	3	2	0	3	R	RER-
22	03.06.33	60	nein	4	2	1	3	re	RER-
23	06.02.22	72	ja	is	0	0	2	re	RER-
24	30.10.35	59	nein	4	3	1	3	li	RER-
25	29.04.12	82	nein	3	3	1	2	R	RER-
26	17.07.21	73	ja	3	1	0	3	re	RER-
27	21.12.55	39	nein	3	2	1	3	R	RER-

Abb. 5